

Title	Investigation of Drug Metabolism by Non-Cytochrome P450 Enzymes and Its Clinical Relevance( Digest_要約 )
Author(s)	Nishihara, Mitsuhiro
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-05-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12834">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12834</a>
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2014-06-01に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

## Investigation of Drug Metabolism by Non-Cytochrome P450 Enzymes and Its Clinical Relevance (非シトクロム P450 酵素による薬物代謝反応とその臨床的意義に関する研究)

西原 光洋

医薬品開発における *in vitro* 薬物代謝研究は、バイオアベイラビリティ (BA)、体内からの消失速度及び薬物間相互作用などの評価において不可欠であり、開発中の薬物が安定的かつ安全に薬効を発揮するための体内動態を有するかを判断する上で、重要な位置付けにある。その中でもヒト代謝酵素発現系やヒト由来試料を用いた試験結果は臨床試験結果に準じて扱われている。多くの薬物の代謝に関与するシトクロム P450 (CYP) は既に詳細な研究が進められており、数多くの研究成果と経験に基づいたドラッグデザインにも応用されている。こうした背景下、CYP 代謝に対して安定な薬物が設計されるようになる一方で、CYP 以外の酵素 (non-CYP 酵素) が代謝に大きく関与する薬物が創出される頻度が増加してきている。本論文では、*in vitro* 薬物代謝研究により、新規排尿障害改善候補薬 TAK-802 及び新規糖尿病治療薬 sipoglitazar が、それぞれ 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) 1 及び UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 により主に代謝されることを明らかにし、これら non-CYP 酵素の同定方法、動物種によって代謝物や代謝速度が異なることの原因、遺伝子多型に関して得た知見を報告する。CYP と比較すると、これら non-CYP 酵素の基礎情報は不十分であり、本研究を通じてその重要性を例証するとともに、これらの酵素の代謝特性と臨床における薬物動態特性の関連性についても論じた。以下に、本研究成果を要約する。

### 1. 新規排尿障害改善候補薬 TAK-802 のヒトにおける主代謝経路: 11 $\beta$ -HSD1 によるカルボニル還元反応の関与

TAK-802 の代謝における動物種差を調べるために、ヒト及び実験動物、*in vitro* 及び *in vivo* における代謝プロファイルの比較を行った。TAK-802 はヒト及び動物肝ミクソローームにおいて主に M-I、M-II、M-III、M-IV に代謝され、特にヒトでの M-IV 生成率は他の動物種より高かった。一方、本化合物を動物に投与後の血漿及び排泄物中には M-IV はほとんど検出されなかったのに対し、臨床試験におけるヒト血漿中 M-IV の AUC<sub>0-48h</sub> (薬物血中濃度-時間曲線下面積) は TAK-802 の約 5 倍高い値であり、*in vivo* における代謝プロファイルは *in vitro* の結果を反映するものであった。そこで、M-IV の生成酵素を同定し、ヒトにおける TAK-802 の代謝経路を明らかにするために *in vitro* での検討を実施した。M-IV が還元代謝物であることを考慮し、その生成酵素としてミクロソームに局在する還元酵素 11 $\beta$ -HSD1 に着目した。バキュロウィルスでヒト 11 $\beta$ -HSD1 を発現させた昆虫細胞由来のミクロソームと TAK-802 をインキュベーションすると M-IV が生成することが確認され、その生成は、11 $\beta$ -HSD 阻害剤であるグリチルレチン酸によって濃度依存的に阻害された。これらの結果は、M-IV の生成に 11 $\beta$ -HSD1 が関与していることを示唆している。一方、ラット 11 $\beta$ -HSD1 では M-IV はほとんど生成せず、ヒトとラットの 11 $\beta$ -HSD1 の基質特異性に種差があることが示された。また、M-II は M-I からではなく M-IV を経由して生成し、CYP 同定試験によって、TAK-802 からの M-I の生成及び

M-IV からの M-II の生成には、共に CYP3A4 が主に関与していることも明らかとなった。以上の結果から、ヒトでの TAK-802 の代謝には 11 $\beta$ -HSD1 と CYP3A4 が主に関与し、TAK-802 の代謝における種差が 11 $\beta$ -HSD1 に起因することが示唆された。

## 2. PPAR- $\gamma$ 、- $\alpha$ 、- $\delta$ 活性を持った新規経口 PPAR アゴニスト Sipoglitazar のラット、サルにおける代謝経路及び *in vitro* でのヒト代謝物組成との比較

Sipoglitazar の薬物動態特性を調べるため、 $[^{14}\text{C}]$ sipoglitazar をラット及びサルに経口及び静脈内投与した。本薬の BA（ラット：95.0%、サル：72.6%）は  $^{14}\text{C}$  の AUC 比から算出された見かけ上の吸収率と同等であったことから、本薬は全身循環に入る前に肝臓などの代謝によって不活性化体へと変換される初回通過効果をほとんど受けないと考えられた。また、ラットにおいて  $[^{14}\text{C}]$ sipoglitazar を経口投与したとき、本薬由来成分は肝臓に比較的高濃度に分布し、標的組織である脂肪組織にもその分布が確認された。ラット及びサルにおける血漿中の主成分は sipoglitazar であった。ラットでは、sipoglitazar は主にグルクロン酸抱合体（sipoglitazar-G）に代謝された後に、胆汁を介して糞中に排泄されるのに対し、サルでは脱エチル体のグルクロン酸抱合体（M-I-G）として尿中に排泄されるほか、脱エチル体（M-I）として糞中に排泄された。以上の結果から、sipoglitazar の代謝経路については、酸化反応とグルクロン酸抱合反応の双方を考慮する必要性が示された。そこで、ラット及びサル肝細胞を用いて sipoglitazar の *in vitro* 代謝試験を実施したところ、代謝速度は両種間で大きく異なり、サル肝細胞中でより代謝的に不安定であった。一方、ヒト肝細胞における代謝速度はサルと同程度であり、生成する代謝物組成もラットに比べてサルに近いことが確認された。実際に、ヒトにおける体内動態はサルに近いことが確認され、肝細胞を用いた検討は、酸化反応とグルクロン酸抱合反応が同時に進行する化合物の消失経路の推定に役立ち、ヒトにおける代謝特性を予測する上で有用であることが示された。

## 3. Sipoglitazar の特異な代謝経路: Sipoglitazar アシルグルクロナイドのシトクロム P450 触媒による酸化反応

動物を用いた sipoglitazar の薬物動態試験結果から、sipoglitazar の消失過程における重要な代謝物として、脱エチル体（M-I）とグルクロン酸抱合体（sipoglitazar-G 及び M-I-G）が考えられた。また、M-I は sipoglitazar を投与されたヒトの血漿中에서도検出された。そこで、ヒトにおける sipoglitazar から M-I への代謝経路を推定するため、*in vitro* 代謝による検討を加えた。ヒト肝細胞や肝ミクロソームを用いた代謝試験から、M-I は sipoglitazar から直接は生成せず、sipoglitazar-G を経由して M-I へ代謝されていることが示唆された。さらに sipoglitazar-G の代謝研究から、sipoglitazar-G の特性及びその代謝について、次の 3 つの点が明らかとなった。1) HPLC、LC-MS/MS、NMR 解析の結果、sipoglitazar-G は sipoglitazar-G1 ( $\beta$ -1-*O*-acyl glucuronide) と sipoglitazar-G2 ( $\alpha$ -2-*O*-acyl glucuronide) の 2 種類のグルクロン酸抱合体から構成されている。2) これらグルクロン酸抱合体の安定性試験から、sipoglitazar-G1 は sipoglitazar-G2 に変換されるが、sipoglitazar-G2 は sipoglitazar-G1 に変換されない。3) ヒト肝ミクロソーム及び CYP 発現ミクロソームを用いた sipoglitazar-G1 と sipoglitazar-G2 の酸化代謝研究から、M-I

は sipoglitazar-G1 からのみ生成し、その過程には CYP2C8 が主に関与している。一般的に、グルクロン酸抱合反応は第二相反応として知られており、化合物は CYP などによる酸化反応（第一相反応）を受けた後に、抱合反応により代謝されるのが殆どである。本検討では、sipoglitazar の代謝過程が通常とは異なるユニークなものであることが示され、酸化反応とグルクロン酸抱合反応の双方が関与する場合、一次反応の経路を特定する際には注意が必要であることが示された。

#### 4. ヒトにおける Sipoglitazar 代謝の主要なグルクロン酸抱合酵素 UGT2B15 の同定 : *In vitro* 解析によるレトロスペクティブな UGT 分子種の同定と UGT2B15\*2 変異の影響

UGT は各分子種に特異的な基質や阻害剤が十分に発見されていないことから、CYP と異なり、その分子種の同定法が確立していない。一方、sipoglitazar は臨床試験において extensive metabolizer や poor metabolizer の存在を示唆する血漿中濃度推移を示し、一塩基多型 (SNP) 解析により、血漿中濃度推移と UGT2B15 の遺伝子多型に相関のあることが明らかとなった。そこで、sipoglitazar の代謝に関与する主要な UGT をヒト肝ミクロソーム及びバキュロウィルスでヒト UGT を発現させた昆虫細胞由来の膜画分を用いた *in vitro* 解析により、同定可能かを検証した。その結果、12 分子種のヒト UGT 発現膜画分を用いて行った代謝試験では、sipoglitazar は他の UGT 分子種よりも UGT1A1、UGT1A3、UGT1A6、UGT2B4、UGT2B15 分子種によって、顕著にグルクロン酸抱合代謝を受けることが確認され、これら 5 分子種の UGT 発現膜画分を用いた kinetics 試験からは、UGT2B4 の関与の可能性は低いことが示唆された。一方、最近の UGT に関するヒト肝臓中での mRNA 発現量に関する知見から、UGT1A3 や UGT1A6 が UGT1A1 よりも sipoglitazar の代謝に大きく貢献するとは考えにくく、上記 5 分子種の UGT の中では、UGT1A1 と UGT2B15 が sipoglitazar の代謝に強く関与していると考えられた。さらに 16 個体別ヒト肝ミクロソームを用いた相関試験では、UGT2B15 の特異的基質である (S)-oxazepam と sipoglitazar のグルクロン酸抱合活性が UGT1A1 の特異的基質である  $\beta$ -estradiol と比較して強い相関を示した。また、哺乳類における UGT1A と UGT2B 酵素の系統樹解析の知見と、ヒトにおける sipoglitazar のグルクロン酸抱合代謝速度がラットよりもサルに近く、種差が認められる点を考慮すると、ラットとサルにおいて系統樹による分類が異なる UGT2B15 の関与の可能性が UGT1A1 よりも高いことが示唆された。以上のヒト肝ミクロソーム及び UGT 発現膜画分を用いた *in vitro* の解析結果から、sipoglitazar のグルクロン酸抱合代謝に関与する主要な UGT 分子種は UGT2B15 であると特定できた。また、His-tag UGT2B15\*1 及び\*2 発現膜画分を用いた kinetics 解析から、sipoglitazar の  $K_m$  値は UGT2B15\*2 の変異により顕著に増大することが明らかとなり、この *in vitro* 解析からも、UGT2B15 の遺伝子多型が sipoglitazar のヒト血漿中濃度推移の個人差の要因であることが示唆された。以上の検討で得られた知見は、*in vitro* 代謝研究が非臨床と臨床試験を繋ぐ架け橋の役割を果たしていることを例証するものであり、臨床試験で起こり得る問題の予測において大きな貢献をなすものであることを示している。